

ШАХ МАХМУД РАИХАН

**ВЛИЯНИЕ 2-(ПАРА-АМИНОБЕНЗОЛСУЛЬФАМИДО)-ТИАЗОЛА НА
РОСТ КУЛЬТУРЫ *SERRATIA MARCESCENS* W1050 И БИОСИНТЕЗ
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИЕ ПУРИНОВ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Филимонова Мария Николаевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
профессор
Госманов Рауис Госманович

кандидат биологических наук,
доцент
Гимадутдинов Олег Александрович

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет», г. Казань

Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «15» октября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Абрамова З. И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эндонуклеаза грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* (Sma nuc, КФ 3.1.4.9) является одной из наиболее изученных бактериальных нуклеаз. Определены многие физико-химические и биохимические свойства этого фермента, выделены и охарактеризованы молекулярные формы, установлены структура и механизм действия [Филимонова с соавт., 1991; Miller *et al.*, 1994; Педерсен с соавт., 1995; Филимонова с соавт., 1996; Friedhoff *et al.*, 1996; Филимонова с соавт., 1997; Benedik and Strych, 1998; Филимонова, 2003; Романова с соавт., 2008].

Эндонуклеазу применяют на практике: в молекулярно-биологических исследованиях в качестве биохимического реактива, в пчеловодстве в качестве противовирусного средства и стимулятора развития пчелиных семей. Есть данные, свидетельствующие о целесообразности ее использования в животноводстве и растениеводстве в качестве противовирусного препарата [Аликин с соавт., 1998; Филимонова с соавт., 1999; Krause and Miller, 2001, Трифонова с соавт., 2002], а также антибактериального препарата широкого спектра действия [Патент РФ №2337139]. Известны ее противоопухолевые свойства [Габдуллина, 1980].

Несмотря на большие успехи, достигнутые в исследовании данного фермента, изучение закономерностей его биосинтеза не утратило своей актуальности, так как получение коммерческого продукта должно быть экономически оправданным, уровень его биосинтеза должен быть высоким. Существуют различные подходы к увеличению биосинтеза. Классические методы включают оптимизацию состава питательной среды и условий выращивания культуры. Возможно использование агентов, на которые бактерии отвечают повышением биосинтеза. В частности известно, что биосинтез эндонуклеазы увеличивается при SOS–ответе клеток на повреждение ДНК или блокирование ее репликации [Юсупова с соавт., 1991, Ball *et al.*, 1990]. Есть данные о том, что биосинтез эндонуклеазы изменяется под действием ингибитора биосинтеза фолиевой кислоты, вызывающего подавление роста культуры и биосинтеза пуриновых нуклеотидов [Старшинова и Филимонова, 2005]. Так как в условиях ингибирования биосинтеза

пуриновых нуклеотидов репликация ДНК также должна быть замедлена, появилось предположение о том, что присутствие в среде такого ингибитора должно привести к увеличению биосинтеза эндонуклеазы. Одновременно возникло предположение, что обогащение среды экзогенными пуринами должно положительно сказаться на росте культуры, и, как следствие этого, на биосинтезе эндонуклеазы. В пользу этого предположения свидетельствовало сформировавшееся мнение о том, что физиологическая роль эндонуклеазы состоит в обеспечении клеток питанием [Беляева с соавт., 1976], и сведения о предпочтении эндонуклеазы к гидролизу фосфодиэфирных связей, обогащенных гуанином [Филимонова с соавт., 1996; Meiss *et al.*, 1995].

Целью настоящего исследования стал анализ биосинтеза эндонуклеазы и роста культуры *S. marcescens* в присутствии экзогенных пуринов и ингибитора биосинтеза фолиевой кислоты 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола, вызывающего ингибирование биосинтеза пуриновых нуклеотидов.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Провести оптимизацию метода получения периплазматической фракции.
2. Провести сравнительный анализ роста культуры и биосинтеза эндонуклеазы в отсутствие и в присутствии пуринов: аденина, аденозина, гуанина, гуанозина, инозина.
3. Определить влияние 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола на рост культуры и биосинтез эндонуклеазы.
4. Исследовать рост культуры и биосинтез эндонуклеазы при одновременном присутствии в среде пуринов и 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола.

Положения, выносимые на защиту:

1. В присутствии 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола происходит подавление роста культуры *S. marcescens* и увеличение биосинтеза эндонуклеазы и продуктивности культуры по эндонуклеазе.
2. Обогащение полноценной синтетической среды одним из пуринов: аденином, аденозином, гуанином, гуанозином или инозином, - не влияет на рост культуры *S. marcescens*, биосинтез эндонуклеазы и продуктивность культуры по эндонуклеазе.

3. Обогащение полноценной синтетической среды одним из пуринов: гуанином, гуанозином или инозином, - в присутствии 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола не влияет на рост культуры *S. marcescens* и оказывает влияние на биосинтез эндонуклеазы и продуктивность культуры по эндонуклеазе.

Научная новизна работы. Впервые исследовано влияние пуринов: аденина, аденозина, гуанина, гуанозина или инозина, - на рост культуры и биосинтез эндонуклеазы *S. marcescens* в присутствии и в отсутствие ингибитора биосинтеза фолиевой кислоты - 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола, вызывающего ингибирование биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, и показано, что присутствие в среде 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола ведет к увеличению биосинтеза эндонуклеазы и продуктивности культуры по эндонуклеазе, а также к качественному и количественному изменению динамики роста культуры и накопления эндонуклеазы в среде и периплазме.

Установлено, что обогащение полноценной синтетической среды одним из пуринов: аденином, аденозином, гуанином, гуанозином или инозином, - не влияет на рост культуры, биосинтез эндонуклеазы и продуктивность культуры по эндонуклеазе и ведет к увеличению доли внеклеточной фракции эндонуклеазы. Напротив, присутствие в среде вместе с 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазолом одного из экзогенных пуринов: гуанина, гуанозина или инозина, - приводит к репрессии клеточного ответа на ингибирование биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, возникающего в их отсутствие.

Обоснована возможность участия эндонуклеазы в пуриновом обмене бактерий *S. marcescens* и наличия у них пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов с реутилизацией пуринов, альтернативного общеизвестному пути биосинтеза нуклеотидов *de novo*.

Практическая ценность работы. Обоснованием практической значимости работы служит оптимизация метода получения периплазматической фракции бактерий *S. marcescens*, который может быть использован при изучении периплазматических белков *S. marcescens*, а также определение условий культивирования, приводящих к росту продуктивности

культуры по эндонуклеазе или увеличению доли внеклеточной фракции эндонуклеазы в синтезированном ферменте, что увеличивает выход эндонуклеазы при ее получении.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены на Первой межуниверситетской конференции по современной биологии «Bionews» (Kazan, 2008); XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009); XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом им. В.И. Ульянова-Ленина и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха «Microbial enzymes in biotechnology and medicine» (Kazan, 2009); 13-ом ежегодном симпозиуме студентов биологов Европы «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders» (Kazan, 2009); а также на итоговых конференциях Казанского государственного университета «Молекулярно-генетические, клеточные и популяционные основы функционирования живых систем» (Казань, 2009, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в журнале, поименованном в списке ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 134 источника, из них 98 зарубежных. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 34 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили бактерии *S. marcescens* W1050, любезно предоставленные профессором университета г. Хьюстона (США) М. Бенедиком.

При исследовании роста культуры и биосинтеза эндонуклеазы использовали среду, включающую (г/л): NaCl – 4.7, NH₄Cl – 1.1, Na₂SO₄ – 0.4, MgCl₂ – 0.95, K₂HPO₄×3H₂O – 2.8, глюкозу – 5, гидролизат казеина – 1 и дрожжевой экстракт – 3, которую засеивали до оптической плотности 0.16–0.2 ед./мл. Культуру выращивали 36 ч при 37°C с принудительной аэрацией на

вибростенде (200 об./мин) в инкубационном шкафу BS4 («B.BRAUN», Германия). На протяжении всего наблюдения через каждые 1-3 ч контролировали изменение оптической плотности культуры, выделяли биомассу и получали периплазматическую фракцию, определяли ферментативную активность в среде и в периплазме.

При исследовании влияния 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола (2-ПАБСТ) и (или) пуринов: аденина, аденозина, гуанина, гуанозина или инозина, - их добавляли в питательную среду перед внесением посевного материала до конечной концентрации, соответственно, 0.01% и 0.0005%.

Периплазматическую фракцию получали, взяв за основу и оптимизировав ранее разработанный Герхардом [Gerhardt *et al.*, 1994] метод получения сферопластов.

Нуклеазную активность определяли методом кислоторастворимых фракций в соответствии с рекомендациями [Nestle and Roberts, 1969; Лещинская с соавт., 1974]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывало увеличение A_{260} в 1 мл раствора на 1 оптическую единицу за 1 ч инкубации при 37°C (Ед./мл).

Биосинтез эндонуклеазы оценивали, суммируя величины нуклеазной активности, определенные в среде и периплазме.

Продуктивность культуры рассчитывали как отношение ферментативной активности к содержанию биомассы, выраженной в единицах оптической плотности культуры.

Активность β -галактозидазы определяли стандартным методом [Миллер, 1976]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности на 1 оптическую единицу при 420 нм в пересчете на 1 мл ферментного раствора за 1 ч инкубации.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью подпрограммы статистического анализа графической программы «Sigma plot 8.0» и программы «Microsoft Excel».

Проводили выбраковку данных для доверительного интервала 95%. Достоверность разницы оценивали с помощью критерия Стьюдента, используя

значения среднего арифметического и стандартной ошибки, полученные после выбраковки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сложность и многоэтапность процессов биосинтеза и секреции эндонуклеазы послужили основной причиной отработки подходов, без которых корректный анализ биосинтеза в рамках поставленной цели не представлялся возможным. В результате был оптимизирован метод получения периплазматической фракции и исследован биосинтез β -галактозидазы – маркера периплазмы бактерий *S. marcescens*. Оптимизированный метод, отличающийся от исходного изменением времени и температуры инкубации клеточной суспензии с лизирующей смесью, состав которой также был модифицирован: в 3 раза увеличена концентрация сахарозы и в 2.5-5 раз - лизоцима, - улучшал эффективность разделения периплазматической фракции и сферопластов по сравнению с исходным методом. Об этом свидетельствовало ярко выраженное преобладание сферопластов над бактериальными клетками в полученных препаратах и многократное различие периплазматической фракции и среды по β -галактозидазной активности на протяжении всего срока наблюдения.

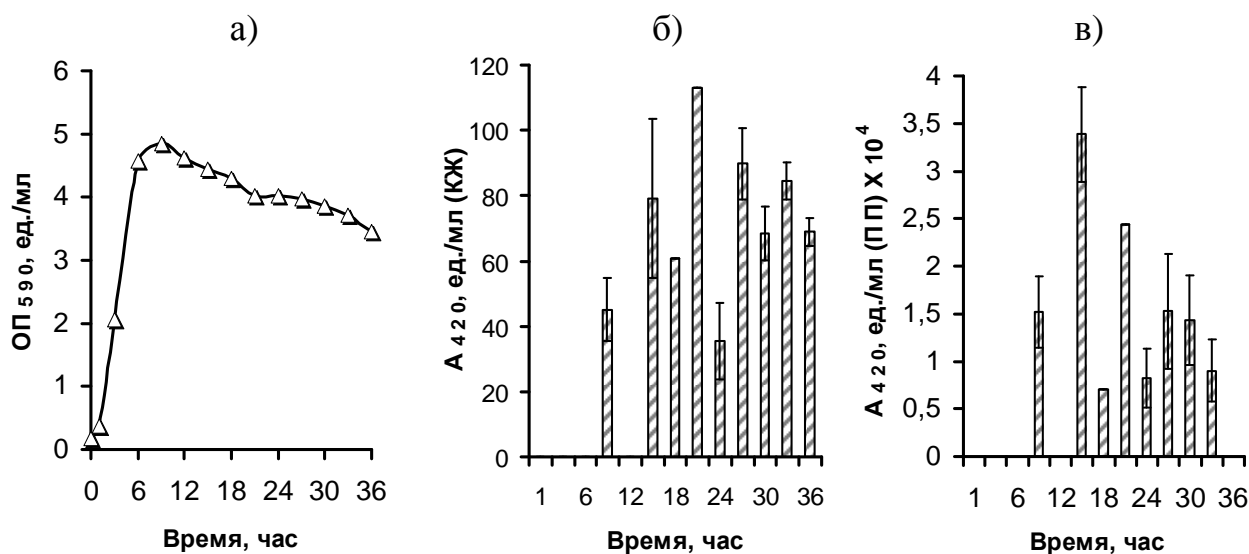


Рисунок 1. Динамика роста культуры (а) и активности β -галактозидазы в среде (б) или в периплазме (в).

Как видно из рисунка 1а, кривая роста культуры имела стандартный вид. Адаптационная фаза была непродолжительной, экспоненциальная, при которой оптическая плотность культуры приближалась к 5 оп.ед./мл, длилась 5 ч. Затем следовала фаза замедления роста (3 ч), плавно переходящая в стационарную фазу, и после этого в фазу отмирания. С замедлением роста культуры наблюдали многократное увеличение уровня нуклеазной активности (рис. 2а), как в среде, так и в периплазме, с пиком, приходящимся на начало стационарного роста (15 ч). После этого уровень нуклеазной активности вне- и внутри бактериальной клетки постепенно понижался почти до исходных величин. На протяжении всего срока наблюдения нуклеазная активность в периплазме была в 5-10 раз выше, чем в окружающей среде. Аналогичным было распределение между клеточными компартментами β -галактозидазы (рис. 1б). При этом β -галактозидазная активность в периплазме была в 100-200 раз выше, чем в среде на протяжении всего срока наблюдения.

1. Рост культуры и биосинтез эндонуклеазы в присутствии пуринов.

Поскольку ранее было показано [Богомольная, 2000], что присутствие в среде нуклеотидов (ГМФ или УМФ) незначительно изменяло биосинтез эндонуклеазы, а ГМФ стимулировал рост культуры, для достижения поставленной цели в исследовании использовали пурины в виде нуклеозидов и азотистых оснований. Установлено, что добавление в среду одного из пуринов: аденина, аденозина, гуанина, гуанозина, инозина, - не влияло на рост культуры и оказывало влияние на динамику накопления эндонуклеазы в среде и в периплазме (рис. 2). Кривые роста в присутствии и в отсутствие пуринов были идентичны.

Уровень активности в среде в присутствии пуринов был в 1.5-2 раза выше, чем в отсутствие пуринов во время стационарного роста культуры. Кроме этого наивысшая активность в среде наблюдалась с 15 по 21 ч роста культуры в присутствии пуринов, и лишь на 15 ч роста в их отсутствие. В периплазме, напротив, в период ранней и средней стационарной фазы активность в присутствии пуринов была в 1.5-2 раза ниже, чем в их отсутствие, а в фазе

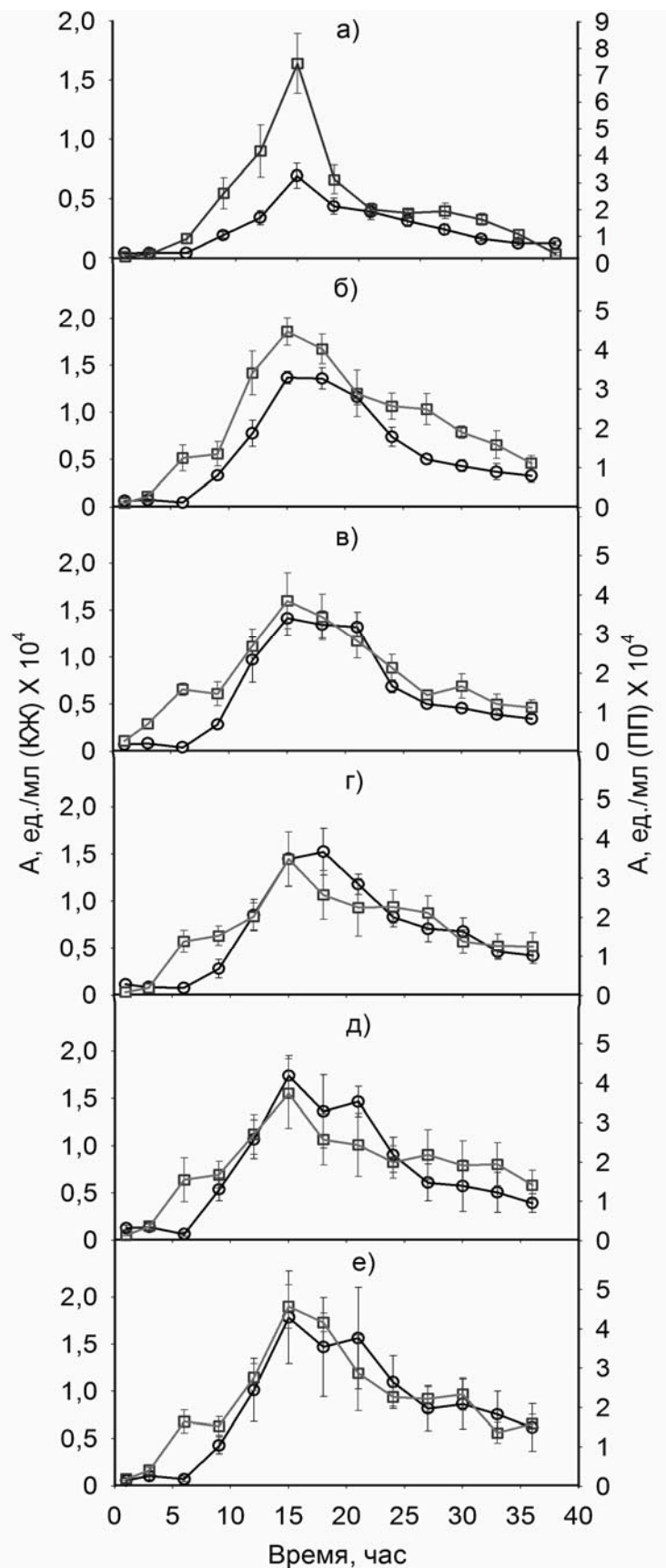


Рисунок 2. Активность эндонуклеазы в среде (-●- (КЖ)) и в периплазме (-■- (ПП)) в отсутствие (а) и присутствии аденина (б), аденозина (в), гуанина (г), гуанозина (д), инозина (е).

замедления роста (6 ч), наоборот, в 1.6 раза выше. Принципиальных различий между кривыми динамики накопления эндонуклеазы в среде, а также в периплазме, обусловленных типом пурина, обнаружено не было. Также не было выявлено принципиальных различий между динамикой биосинтеза эндонуклеазы в целом в отсутствие или в присутствии пуринов, независимо от типа пурина (рис. 3). Аналогичной была картина динамики продуктивности культуры по эндонуклеазе (рис. 4). Для более точной количественной оценки полученные значения были, соответственно, просуммированы и показано отсутствие достоверной разницы между соответствующими суммами в отсутствие и в присутствии пуринов (рис. 5). Таким образом, добавление к среде пуринов не влияло на рост культуры, количество

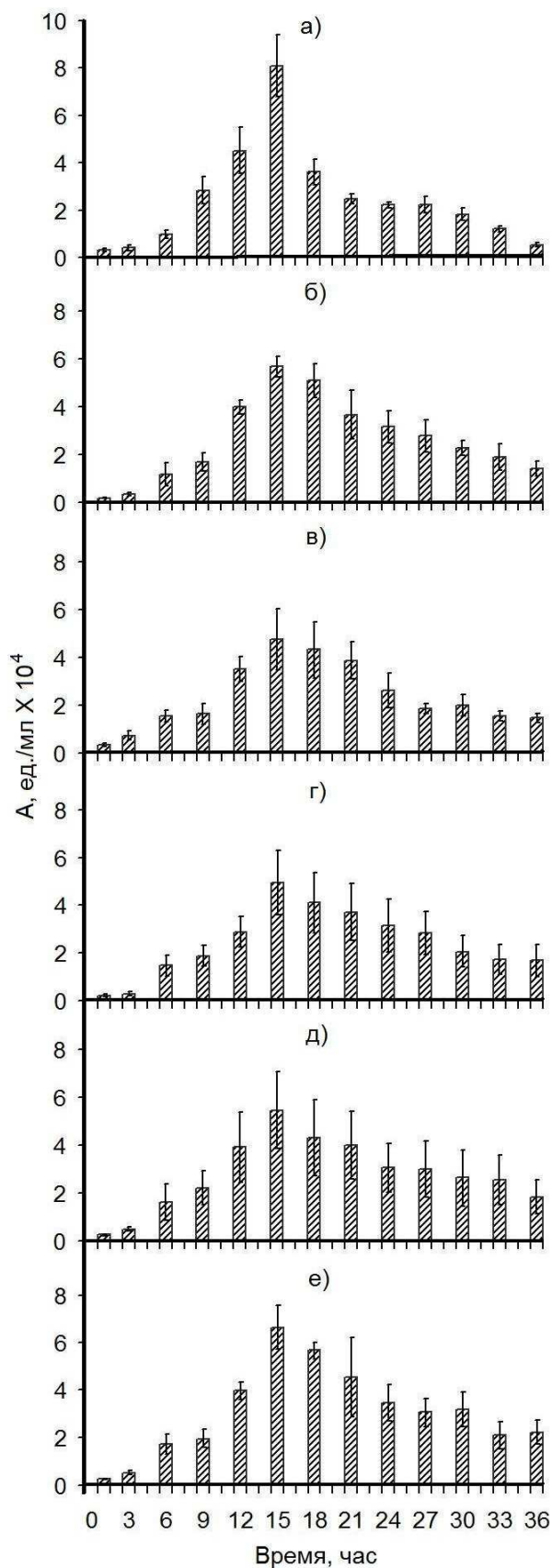


Рисунок 3. Динамика биосинтеза эндонуклеазы в отсутствие (а) и в присутствии аденина (б), аденозина (в), гуанина (г), гуанозина (д), инозина (е).

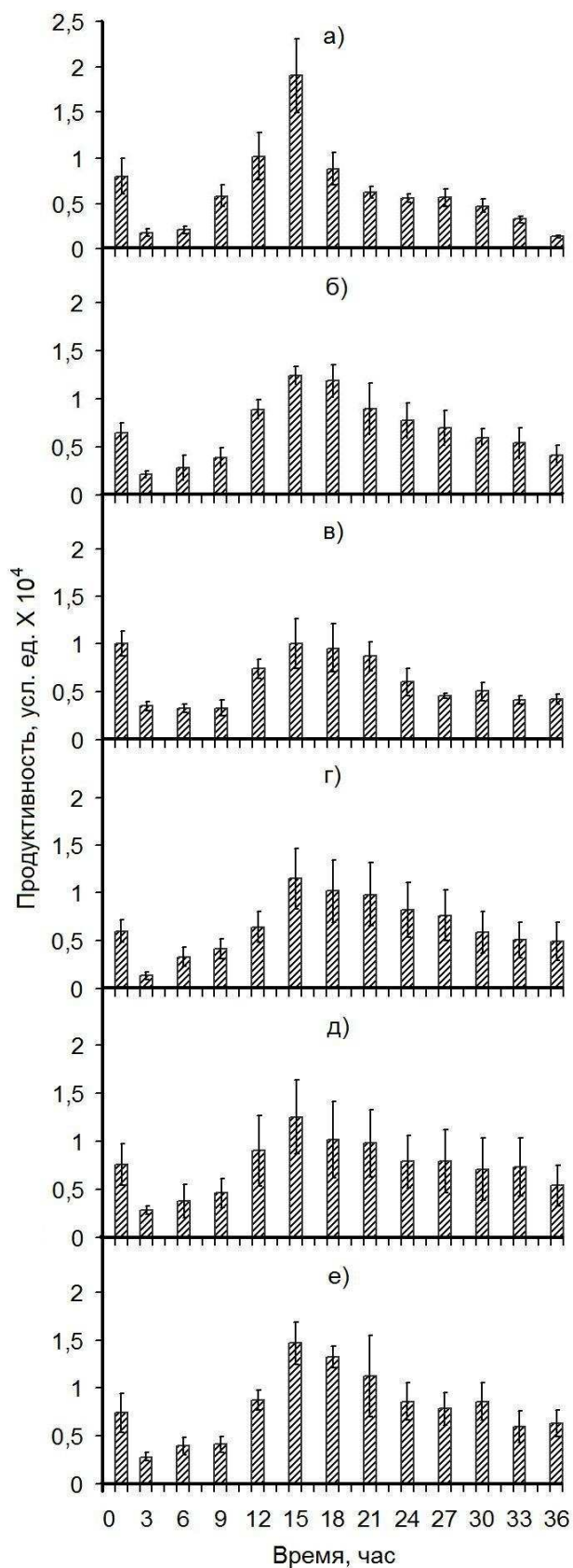


Рисунок 4. Динамика продуктивности культуры по эндонуклеазе в отсутствие (а) и в присутствии аденина (б), аденозина (в), гуанина (г), гуанозина (д), инозина (е).

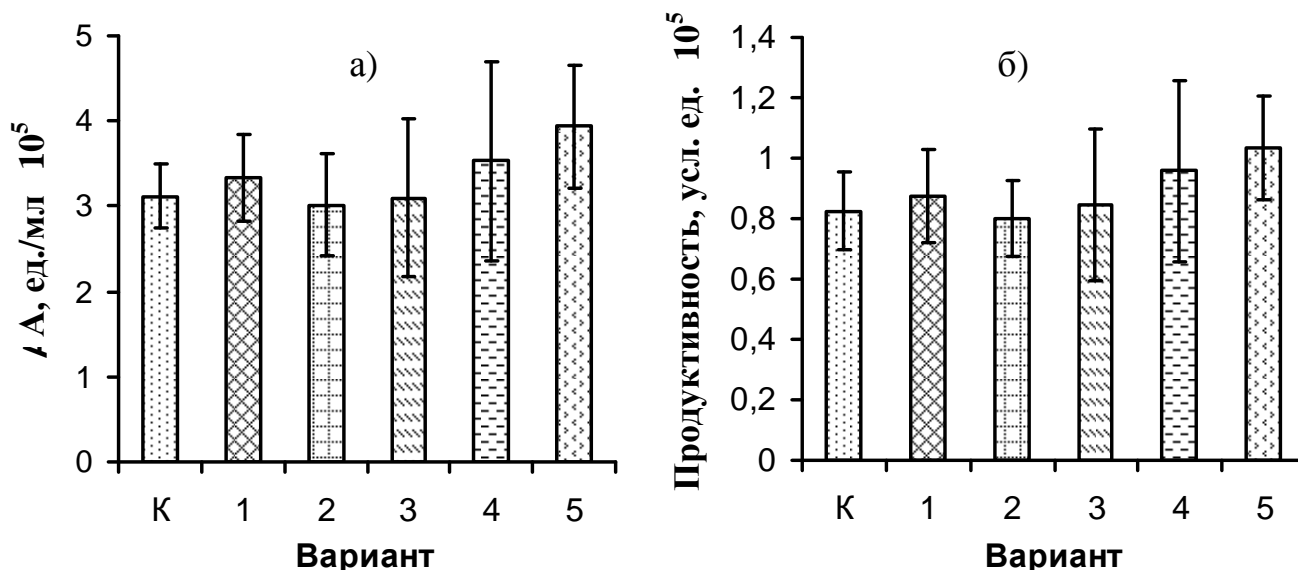


Рисунок 5. Сумма значений биосинтеза эндонуклеазы (а) и продуктивности культуры по эндонуклеазе (б) при росте в отсутствие (К – контроль) и в присутствии аденина (1), аденозина (2), гуанина (3), гуанозина (4), инозина (5).

синтезированной эндонуклеазы и продуктивность культуры и отражалось лишь на соотношении фракций эндонуклеазы, локализованных в среде и в периплазме.

Увеличение содержания в среде пурина в 20 раз не оказывало существенного влияния на полученные результаты, что было продемонстрировано на примере гуанина.

2. Влияние 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола на рост культуры и биосинтез эндонуклеазы

Предварительная оценка содержания в среде 2-ПАБСТ показала, что в период со 2-го по 4-й ч роста культуры его содержание скачкообразно снижается примерно на 20% и затем сохраняется на одном уровне до конца наблюдения.

Добавление в среду 2-ПАБСТ приводило к подавлению роста культуры, что проявлялось снижением оптической плотности (рис. 6) и служило косвенным доказательством ингибирования биосинтеза пуринов *de novo*, которое, очевидно, приводило к недостатку пуринов внутри клетки. Под действием 2-ПАБСТ продолжительность адаптационной и экспоненциальной

фаз возрастала в 2-3 раза, а срока достижения наибольшей оптической плотности культуры - почти в 2.5 раза. Кривая роста ступенчатым видом напоминала кривую роста синхронной культуры. Одновременно наблюдались изменения в динамике накопления эндонуклеазы в среде и в периплазме.

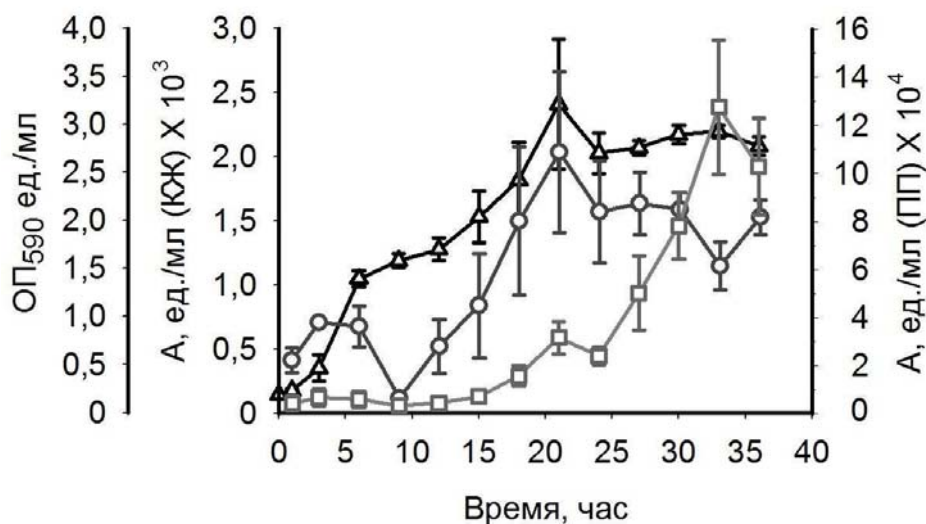


Рисунок 6.
Динамика роста
(-Δ-, (ОП₅₉₀)) и
активности
эндонуклеазы в
среде (-О-, (КЖ))
или в периплазме
(-□-, (ПП)).

На кривой накопления эндонуклеазы в среде появлялся дополнительный пик активности с максимумом на 3-6 ч роста культуры. Следующий пик активности, который наблюдали в среде на 18-24 ч, почти в 2.5 раза превосходил по величине первый и примерно во столько же раз был меньше аналогичного пика на кривой накопления эндонуклеазы в отсутствие 2-ПАБСТ, возникающего на 15 ч роста культуры (рис. 2а). Кроме этого в присутствии 2-ПАБСТ сохранялся высокий уровень нуклеазной активности в среде и на позднем этапе роста культуры. В периплазме уровень эндонуклеазы в присутствии в среде 2-ПАБСТ многократно увеличивался при переходе культуры к стационарному росту и достигал наибольшей величины - почти в 2 раза выше активности пиковой фракции (15 ч) в отсутствие 2-ПАБСТ (рис. 2а) - на 36 ч роста культуры.

Аналогичной была тенденция изменений в динамике накопления β-галактозидазы (в периплазме и в среде). При этом, на протяжении всего срока наблюдения уровень β-галактозидазной активности в периплазме был много

выше, чем в среде, что свидетельствовало о сохранении интактной клеточной оболочки при выделении биомассы в ходе эксперимента.

Сравнительный анализ динамики биосинтеза (рис. 7а) показал, что в присутствии 2-ПАБСТ биосинтез эндонуклеазы многократно возрастал в период стационарного роста культуры (27-36 ч). По сумме значений биосинтез эндонуклеазы в присутствии 2-ПАБСТ был выше, чем в его отсутствие примерно в 1.5 раза (рис. 7б). Продуктивность культуры по эндонуклеазе

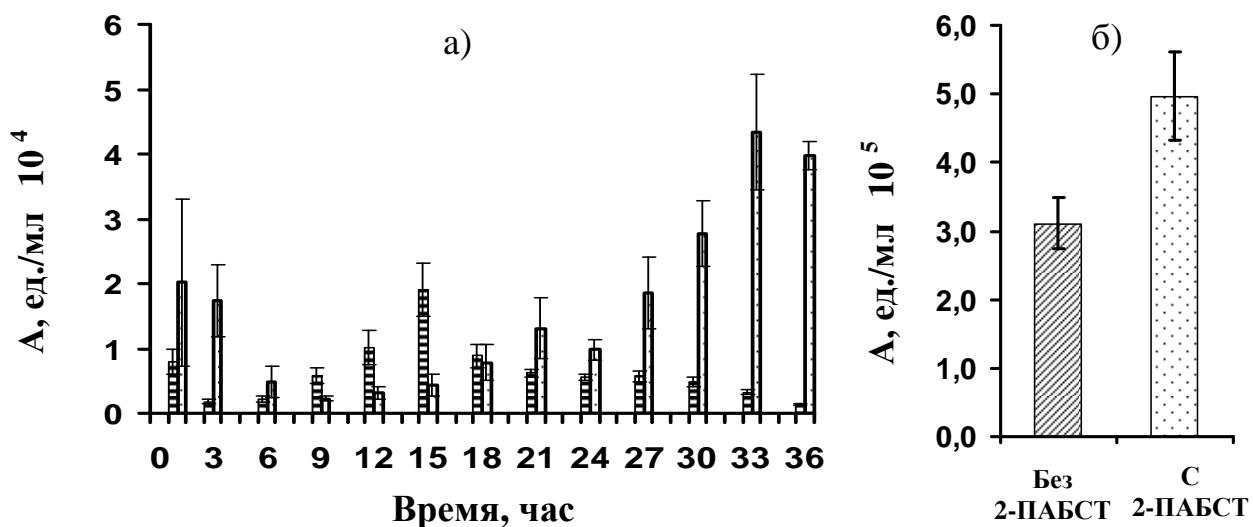


Рисунок 7. Динамика (а) и сумма значений биосинтеза (б) эндонуклеазы в отсутствие (▨) и в присутствии 2-ПАБСТ (▤).

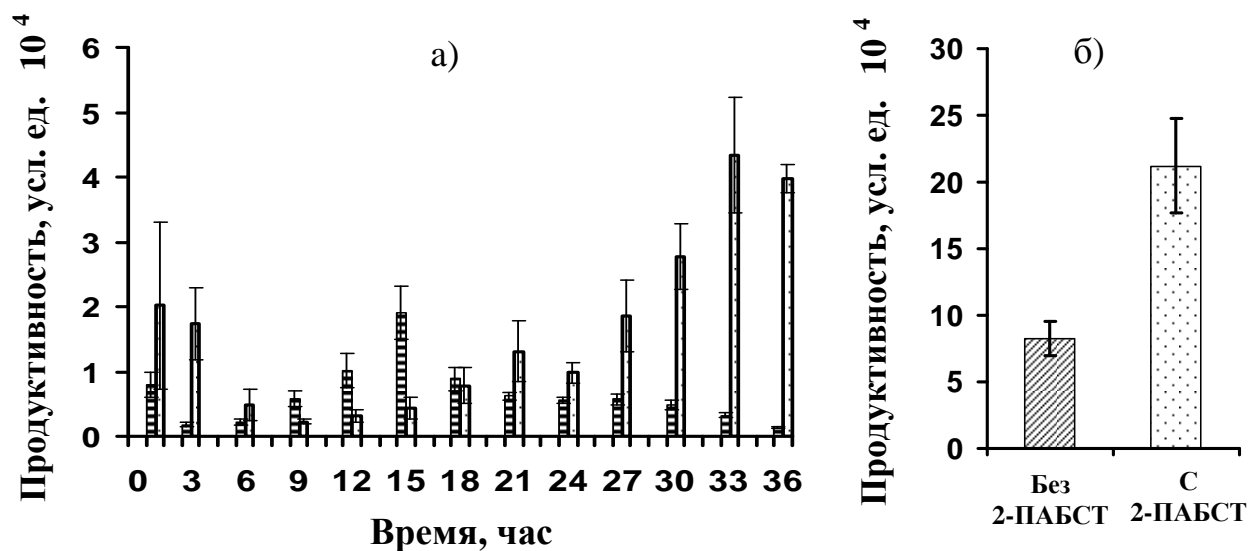


Рисунок 8. Динамика (а) и сумма значений продуктивности культуры по эндонуклеазе (б) в отсутствие (▨) и в присутствии 2-ПАБСТ (▤).

(рис. 8а) многократно возрастали на 3 ч роста, что совпадало с первым пиком на кривой накопления эндонуклеазы в среде, и на 21-36 ч - период стационара. По сумме значений продуктивность культуры под действием 2-ПАБСТ возрастала примерно в 2.5 раза (рис. 8б).

Таким образом, показано, что ингибирование биосинтеза пуринов *de novo* приводило к усилению биосинтеза эндонуклеазы и росту продуктивности культуры по эндонуклеазе, что, вероятно, служит механизмом компенсации недостатка внутриклеточных пуринов, возникающего под действием 2-ПАБСТ, экзогенными пуринами, образующимися при гидролизе нуклеиновых кислот.

В пользу этого предположения свидетельствовали результаты, полученные при анализе биосинтеза эндонуклеазы в присутствии 2-ПАБСТ и экзогенных пуринов.

3. Влияние пуринов на рост культуры и биосинтез эндонуклеазы в присутствии 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола

Присутствие в среде пуринов: аденина, аденозина, гуанина, гуанозина, инозина, - не влияло на рост культуры, который был подавлен под действием 2-ПАБСТ, увеличивало уровень нуклеазной активности в среде (рис. 9, б) и, наоборот, понижало его в периплазме. Одновременно наблюдались различия в кривых накопления эндонуклеазы в среде – наиболее выраженные в присутствии аденозина (рис. 9б) и в периплазме – под действием гуанина, гуанозина или инозина (рис. 9в-д). Количественные изменения в динамике биосинтеза и продуктивности культуры по эндонуклеазе были наиболее ярко выражены в присутствии гуанина или гуанозина (рис. 10, 11). Сумма значений биосинтеза фермента, а также продуктивности культуры по эндонуклеазе в присутствии в среде гуанина или гуанозина или инозина была почти в 2 раза меньше, чем в его отсутствие (рис. 12). Увеличение содержания пурина в 20 раз не влияло на полученные результаты, что продемонстрировано на примере гуанина. Таким образом, присутствие в среде вместе с 2-ПАБСТ одного из пуринов: гуанина, гуанозина или инозина, - подавляло предполагаемый ответ клетки на ингибирование биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, который в их отсутствие проявлялся увеличенным биосинтезом эндонуклеазы и возросшей продуктивностью культуры по эндонуклеазе.

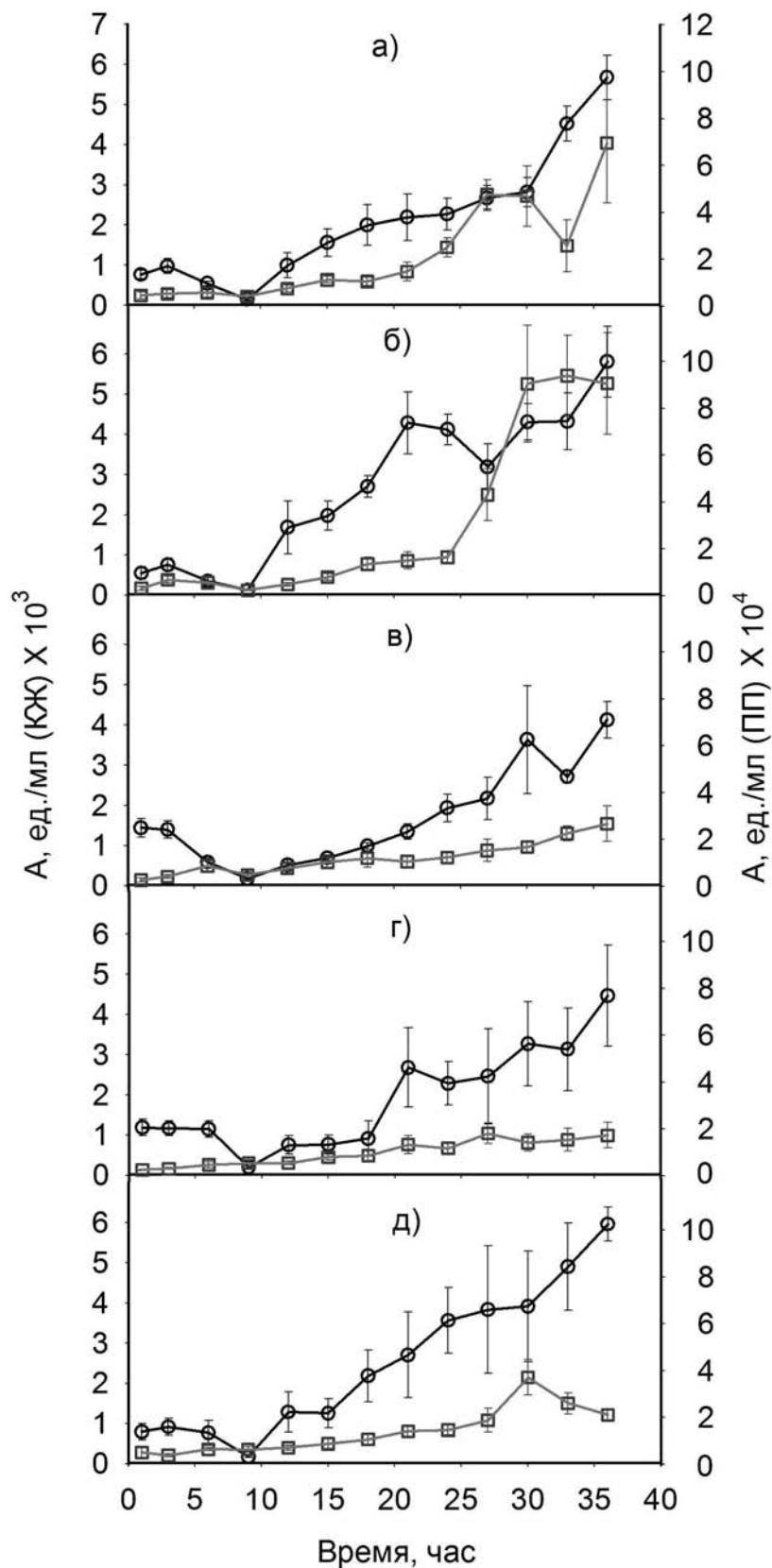


Рисунок 9. Активность эндонуклеазы в среде (●- (КЖ)) и в периплазме (-■- (ПП)) после добавления аденина (а), аденозина (б), гуанина (в), гуанозина (г), инозина (д).

В отсутствие 2-ПАБСТ наличие в среде экзогенных пуринов независимо от их типа и количества не приводит ни к индукции, ни к репрессии биосинтеза эндонуклеазы. Установленный факт, очевидно, не противоречит результатам, полученным в присутствии в среде пуринов вместе с 2-ПАБСТ, а лишь свидетельствует о том, что при росте на полноценной синтетической среде бактерии *S. marcescens*, аналогично *H. pylori* [Mendz *et al.*, 1997], предпочитают использованию готовых пуринов, локализованных в питательной среде, биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo*.

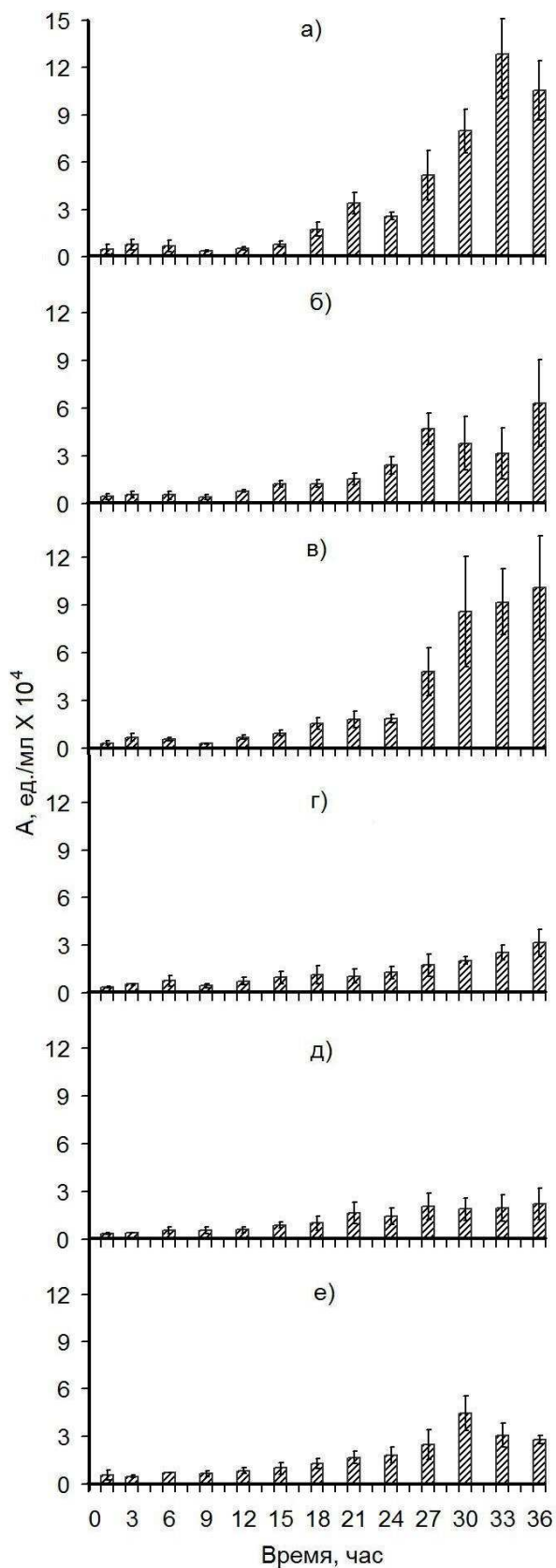


Рисунок 10. Динамика биосинтеза эндонуклеазы в отсутствие (а) и в присутствии аденина (б), аденозина (в), гуанина (г), гуанозина (д), инозина (е).

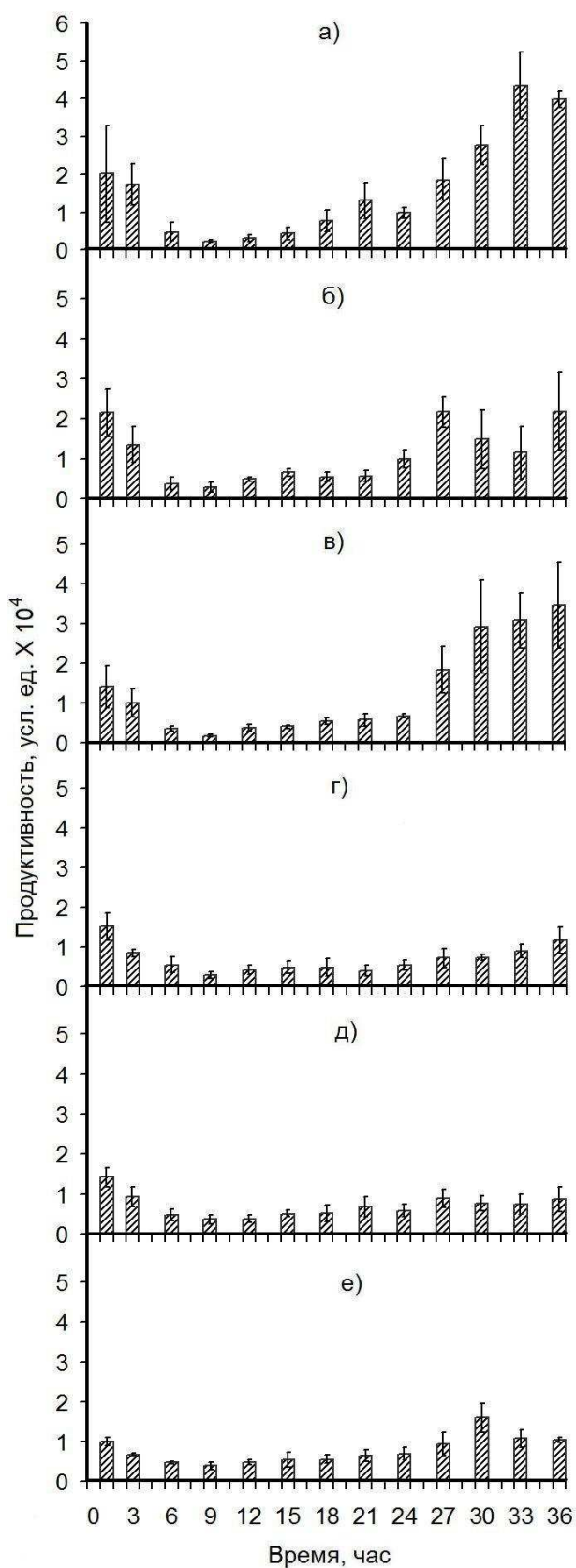


Рисунок 11. Динамика продуктивности культуры по эндонуклеазе в отсутствие (а) и в присутствии аденина (б), аденозина (в), гуанина (г), гуанозина (д), инозина (е).

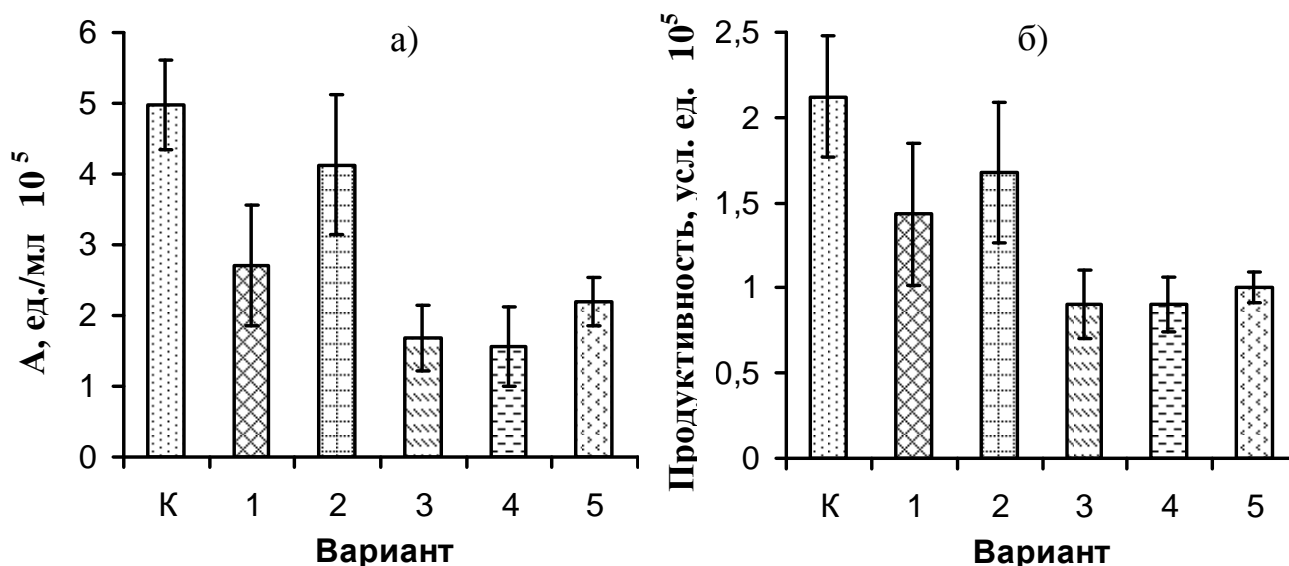


Рисунок 12. Сумма значений биосинтеза эндонуклеазы (а) и продуктивности культуры по эндонуклеазе (б) при росте в отсутствие (К – контроль) и в присутствии аденина* (1), аденозина* (2), гуанина (3), гуанозина (4), инозина (5).

* Разница с контролем недостоверна.

Хотя прямых доказательств проникновения пуринов из среды в клетки *S. marcescens* нет, в пользу этого свидетельствует изменение биосинтеза эндонуклеазы и продуктивности культуры по эндонуклеазе под действием гуанина, гуанозина или инозина в условиях ингибирования биосинтеза пуринов. Биосинтез нуклеотидов из готовых предшественников: азотистых оснований, нуклеозидов и прочие, - образующихся внутри клетки или вне ее при катаболических реакциях, – это известный путь для ряда организмов [Zalkin and Nygaard, 1996; Becerra and Lazcano, 1998; Xi *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2001; Tozzi *et al.*, 2006]. Этот путь - альтернативный пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* - включает реакции реутилизации пуринов. Хотя настоящее время нет сведений, подтверждающих или опровергающих наличие такого пути в метаболизме *S. marcescens*, известно, что в клетках этих бактерий встречается ключевой фермент пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов из готовых предшественников - пуриновый нуклеозид фосфорилаза [Choi, 1998]. В связи с этим и на основании полученных результатов в диссертационной работе делается заключение о том, что бактерии *S. marcescens*

способны синтезировать пуриновые нуклеотиды из готовых предшественников, а эндонуклеаза - одна из самых мощных в настоящее время дезоксирибонуклеат (рибонуклеат) – 5'-нуклеотидогидролаз является активным участником этого процесса.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизация метода получения периплазматической фракции, включающего 30 мин инкубацию клеточной суспензии при комнатной температуре в 30 мМ Трис-HCl буфере, рН 8.0, в присутствии 20% сахарозы, 0.7% фенилметилсульфонилфторида, 10 мМ К-ЭДТА и 0.05% лизоцима, которая заключалась в увеличении времени инкубации в 4 раза, температуры до 37°C, концентрации сахарозы в 3 раза и лизоцима в 2.5-5 раз, повышала эффективность и избирательность нарушения целостности наружной мембраны и клеточной стенки.

2. Обогащение полноценной синтетической среды одним из пуринов: аденином, аденозином, гуанином, гуанозином или инозином, - не влияет на рост культуры *Serratia marcescens*, биосинтез эндонуклеазы и продуктивность бактерий по эндонуклеазе и ведет к увеличению доли внеклеточной фракции эндонуклеазы.

3. Установлено, что добавление в питательную среду 0.1% 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола, ведущее к ингибированию биосинтеза фолиевой кислоты, а следовательно, и к ингибированию синтеза пуриновых нуклеотидов, приводит к увеличению биосинтеза эндонуклеазы и продуктивности культуры по эндонуклеазе, сопряженных с качественным и количественным изменением динамики роста культуры и накопления эндонуклеазы в среде и периплазме, а также с увеличением доли периплазменной фракции фермента во время стационарного роста.

4. Присутствие в среде вместе с 2-(*para*-аминобензолсульфамидо)-тиазола одного из пуринов: гуанина, гуанозина или инозина, - приводит к репрессии

клеточного ответа на ингибирование биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, возникающего в их отсутствие.

5. В условиях ингибирования биосинтеза фолиевой кислоты, а следовательно, и ингибирования биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, бактерии *S. marcescens* синтезируют пуриновые нуклеотиды с помощью биохимических реакций пути реутилизации экзогенных гуанина, гуанозина или инозина, в образовании которых принимает непосредственное участие бактериальная эндонуклеаза.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шах Махмуд, Р.** О получении цитоплазматической фракции бактерий *Serratia marcescens* / Р. Шах Махмуд, М. Н. Филимонова // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2010. – Т. 152, кн. 1. – С. 121-126.

2. **Шах Махмуд, Р.** Биосинтез эндонуклеазы *Serratia marcescens* в присутствии пуринов и ингибитора их биосинтеза / Р. Шах Махмуд, М. Н. Филимонова // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2010. – Т. 152, кн. 2. – С. 166-171.

3. **Шах Махмуд, Р.** Влияние пуриновых нуклеозидов на рост и биосинтез эндонуклеазы *Serratia marcescens* в условиях ингибирования биосинтеза пуринов / Р. Шах Махмуд, М. Н. Филимонова // III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010»: сб. тезисов. – Нижний Новгород, 2010. – С. 83.

4. **Шах Махмуд, Р.** Действие экзогенных пуринов на биосинтез и продукцию эндонуклеазы *Serratia marcescens* в присутствии 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола / Р. Шах Махмуд, М. Н. Филимонова // 14-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «биология – наука XXI века»: сб. тезисов. – Пущино, 2010. – Т. 2. – С. 274.

5. **Шах Махмуд, Р.** Изменение активности эндонуклеазы *Serratia marcescens* и ее биосинтез в субоптимальных условиях / Р. Шах Махмуд., Г. М. Галиева, Л.

Ш. Нигматуллина// Научно-практическая конференция «Становление и достижения биохимической школы казанского университета», посвященная памяти проф. В.Г. Винтера: сб. материалов. – Казань, 2009. – С. 140-141.

6. **Shah Mahmud, R.** Effect of adenine on growth of bacteria and biosynthesis and secretion of *Serratia marcescens* nuclease in the presence of purine inhibitor / R. Shah Mahmud, M. N. Filimonova // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders».- Kazan, 2009.- P. 66.

7. **Shah Mahmud, R.** Probability of purine salvage pathway in bacteria *Serratia marcescens* / R. Shah Mahmud, M. N. Filimonova // Abstracts of the XIV International Conference Devoted to the 20th Anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen university «Microbial enzymes in biotechnology and medicine».- Kazan, 2009.- P. 60-61.

8. **Шах Махмуд, Р.** Рост и биосинтез эндонуклеазы *Serratia marcescens* в условиях ингибирования биосинтеза пуринов / Р. Шах Махмуд // XVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов»: тезисы докладов – Москва, 2009. – С. 178.

9. **Shah Mahmud, R.** Effect of 2-para-aminobenzolsulfamidothyazole on biosynthesis and secretion of *Serratia marcescens* nuclease / R. Shah Mahmud, M. N. Filimonova // Building the Future in Biology “Bionews”: Proceedings of the First Interuniversity Conference on Modern Biology. - Kazan, 2008. - P. 30.